

利用 RT-PCR 检测柑桔碎叶病毒的研究

唐科志, 周常勇*, 王雪峰, 周彦, 刘科宏, 刘英

(中国农业科学院柑桔研究所, 重庆 400712)

Detection of *Citrus tatter leaf virus* (CTLV) by RT-PCR TANG Ke-zhi, ZHOU Chang-yong, WANG Xue-feng, ZHOU Yan, LIU Ke-hong, LIU Ying (Citrus Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712, China)

文章编号: 0412-0914(2005)06-0118-02

柑桔碎叶病毒(*Citrus tatter leaf virus*, CTLV)的传统检测方法是指示植物测定,该方法检测周期较长,且需要温、网室等配套设施;酶联免疫吸附方法(ELISA)可用于检测 CTLV^[1],但使用的是针对苹果茎沟病毒(ASGV)的抗体,虽然 CTLV 和 ASGV 的亲缘关系已经得到证实^[2],但到目前为止没有对中国的分离株进行实验验证,这在一定程度上影响了结果的可靠性。本研究应用 Halistones 等^[3]建立的半巢式 RT-PCR 技术对已感病柑桔品种进行了周年检测,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 供试材料

指示植物 Rusk 枳橙和已感染柑桔碎叶病的大叶大果锦橙、梓潼脐橙、脆香甜柚由中国农业科学院柑桔研究所提供。

1.2 dsRNA 的快速抽提

抽提方法按周常勇等^[4]报道的方法进行。取

抽提液 1 μ L 用于作 RT-PCR。

1.3 引物的设计和半巢式 RT-PCR 检测

引物序列设计参见 Halistones 等^[3]的方法,如表 1 所示。由上海生工合成。

1.4 半巢式 RT-PCR 检测

参照 Halistones 等^[3]的方法,稍加改动。第一轮扩增反应总体积为 10 μ L,加模板 1 μ L,水 1 μ L 混合,变性后加入 8 μ L 的反应混合液 42 $^{\circ}$ C 反转录 30 min 后,94 $^{\circ}$ C 2 min。94 $^{\circ}$ C 20 s,退火温度 15 s,72 $^{\circ}$ C 20 s,其中退火温度从 66 $^{\circ}$ C 到 58 $^{\circ}$ C 递降,接下来退火温度在 57 $^{\circ}$ C 6 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

第二轮反应加入 10 μ L 反应混合液,94 $^{\circ}$ C 15 s,55 $^{\circ}$ C 15 s,72 $^{\circ}$ C 20 s,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 反应结束后,取扩增产物 5 μ L 在 1.5% 的琼脂糖凝胶上电泳,然后在 1 μ g/mL 的溴化乙锭中浸泡 20 min 后用凝胶成像仪(Bio-Rad Gel. Doc EQ)观察结果。

Table 1 The sequences of oligonucleotide primers used in the study

Name	Orientation	Sequence(5' to 3') ^A	Target
CTLV1.4	Sense	⁵⁷⁸³ GGAGCTTTACCTTCTTCTTTG ⁵⁸⁰³	CTLV
CTLV2.5	Sense	⁶⁰³¹ CCTTTGCTGCCACTTCTAG ⁶⁰⁴⁹	CTLV
CTLV1.5	Antisense	⁶³⁵⁴ CCTAACCCCTCCAGTTCAG ⁶³³⁶	CTLV
CTLV1.6	Antisense	⁵⁸⁰³ CAAAGAAGAAGGTAAAGCTCC ⁵⁷⁸³	CTLV1.4

A: Numbers refer to positions in the sequence of CTLV from lily(isolate Li-23)

收稿日期: 2005-03-25; 修回日期: 2005-11-10

基金项目: 国家重点科技攻关项目子专题资助(2001BA509B04)

通讯作者: 周常勇, 研究员, 博士生导师; E-mail: changyong@hotmail.com.

1.5 生物学鉴定

把已感病的寄主材料分别嫁接接种到 Rusk 枳橙上,以不接种的 Rusk 枳橙作为阴性对照。温室温度保持 20~25℃。以枳橙叶片形成褪绿斑为发病症状。

2 结果与分析

2.1 生物学鉴定

已感病的寄主材料嫁接接种 Rusk 枳橙后,每隔 2 个星期调查一次,接种 4 个星期后开始陆续发病,症状表现为新叶形成褪绿黄斑。说明这 3 种寄主材料都带 CTLV。

2.2 RT-PCR 检测结果

对 3 种已感病的寄主材料进行了全年检测,每月中旬采集叶或皮,提取 dsRNA 进行 RT-PCR 检测,结果每月均有特异性的条带出现,表明 RT-PCR 可以全年对田间的柑桔植株进行检测;但在 7、8 月份温度较高时,经 RT-PCR 后电泳条带较弱(图 1)。

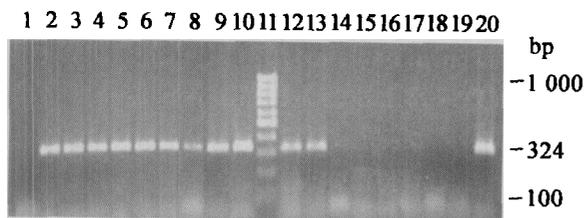


Fig. 1 RT-PCR detection of CTLV extracted from field diseased tree in one year

1: Water control; 2: January; 3: February; 4: March; 5: April; 6: May; 7: June; 8: July; 9: September; 10: October; 11: DNA marker with 100 bp ladders (bp: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100); 12: November; 13: December; 14: August; 15-19: Negative control; 20: Positive control.

3 讨论

通过与指示植物的比较检测,表明 RT-PCR 的检测结果与之一致。但是指示植物测定周期长,且需要温、网室等配套设施;而 RT-PCR 检测方法快速、灵敏,可对田间样品进行直接检测。

运用该方法对感病样品进行了全年检测,结果验证了该方法的可靠性。但在 7、8 月份温度较高时,经 RT-PCR 后电泳条带较弱,可能病毒含量较低。

参考文献

- [1] Kawai A, Tsukamoto T, Namba S, *et al.* Citrus tatter leaf virus: A review of its properties and the development of a serological detection system[C]. California: University of California, Riverside, 1996. 339-342.
- [2] Yoshikawa N, Imaizumi M, Takahashi T, *et al.* Striking similarities between the nucleotide sequence and genome organization of citrus tatter leaf and apple stem grooving Capilloviruses[J]. Journal of General virology, 1993, 74: 2743-2747.
- [3] Hailstones D L, Bryant K L, Broadbent P, *et al.* Detection of citrus tatter leaf virus with reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)[J]. Australasian Plant Pathology, 2000, 29: 240-248.
- [4] 周常勇, Deborah H, Rachael C, *et al.* 一种微量、快速抽提柑橘衰退病毒(CTV)核酸应用于 RT-PCR 扩增的方法[J]. 福建农业大学学报, 2001, 30(增刊): 200.